



open access journal

# pediatric reports

eISSN 2036-7503 | [www.pagepress.org/pr](http://www.pagepress.org/pr)

IV Workshop

## AIEOP... in Lab

Napoli, 14-15 settembre 2015



**PEDIATRIC REPORTS** is an Open Access, peer-reviewed journal which publishes research articles, reviews, and case reports regarding all disorders and diseases in neonates, children and adolescents, as well as related molecular genetics, pathophysiology, and epidemiology.

**Editor-in-Chief**  
Maurizio Aricò, Florence, Italy

**Editorial Staff**  
Emanuela Fusinato, Managing Editor  
Claudia Castellano, Production Editor  
Cristiana Poggi, Production Editor  
Tiziano Taccini, Technical Support

All PAGEPress journals are Open Access. PAGEPress articles are freely available online and deposited in a public archive immediately upon publication. You are free to copy, distribute, and reuse PAGEPress content as long as you credit the original author and source.

**PEDIATRIC REPORTS** is published by PAGEPress Publications, a division of MeditGroup and is completely free online at [www.pagepress.org](http://www.pagepress.org). Publishing costs are offset by a publication fee charged to authors.

#### Copyright Information

All works published in PAGEPress journals are subject to the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) unless otherwise noted. Copyright is retained by the authors. Any non-commercial reuse is permitted if the original author and source are credited.

#### Correspondence

Our publishing offices are located in via Giuseppe Belli 4, 27100 Pavia, Italy. Our telephone number is +39.0382.1751762 and our fax number is +39.0382.1750481. E-mail: [info@pagepress.org](mailto:info@pagepress.org)

For more information and manuscript submission please go to <http://www.pagepress.org/pr>

# IV Workshop

## AIEOP... in Lab

### Napoli, 14-15 settembre 2015

Pediatric Reports 2015  
[volume 7]  
[supplement 1]

genico nella definizione del fenotipo in patologie mendeliane. A tale scopo, abbiamo recentemente allestito un pannello più grande comprendente 34 geni e uno di geni modificatori del fenotipo. Oltre ad ottenere una diagnosi definitiva, conoscere le basi genetiche dei pazienti AEE può essere utile anche per orientare meglio il loro trattamento.

#### Co-008

##### FANCA NEL MITOCONDRIO: QUALCHE RUOLO DIRETTO?

R. Bottega,<sup>1</sup> S. Ravera,<sup>2</sup> D. De Rocco,<sup>1</sup> R. Bortul,<sup>3</sup> M. Faleschini,<sup>1</sup> E. Nicchia,<sup>1</sup> E. Cappelli,<sup>4</sup> C. Dufour,<sup>4</sup> M. Zweyer,<sup>3</sup> A. Savoia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Trieste, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste; <sup>2</sup>Dipartimento di Farmacia, Università di Genova, Genova; <sup>3</sup>Università di Trieste, Trieste; <sup>4</sup>IRCCS Giannina Gaslini, Genova, Italia

**Scopo.** Anemia di Fanconi (FA) è una malattia geneticamente eterogenea caratterizzata da instabilità cromosomica, anomalie congenite, pancitopenia, e predisposizione al cancro. Nonostante i geni FA siano noti per la loro funzione nel riparo del DNA mediante ricombinazione omologa, i loro prodotti genici sono presenti anche nel citoplasma, suggerendo altre funzioni. Analizzando la presenza di FANCA in linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni in FANCA, abbiamo scoperto che in alcune cellule la proteina mutante era espressa. Questo aspetto è stato approfondito al fine di individuare qualsiasi attività residua di queste forme e di esplorare funzioni alternative di FANCA.

**Metodi.** Linee cellulari linfoblastoidi con mutazioni nel gene FANCA (n=30) sono state analizzate mediante Western blot per determinare il livello di espressione di FANCA. Alcune di queste sono state ulteriormente analizzate tramite microscopia elettronica e saggi di immunogold. La funzionalità mitocondriale è stata determinata tramite procedure standard. **Risultati.** In cellule con mutazioni deleterie (nonsense e frameshift) su entrambi gli alleli FANCA non era espressa (neFANCA); tuttavia è stata rilevata la proteina FANCA mutata (eFANCA) allo stesso livello dei controlli o al 50% quando entrambi o solo uno degli alleli, rispettivamente, erano colpiti da mutazioni missense o piccole insdel in frame. Nelle cellule eFANCA, FANCD2 non è ubiquitinata e queste forme mutate risultano espresse solo nel citoplasma, dove la microscopia elettronica non ha rilevato aggregati come invece ci si aspetterebbe nel caso di proteine mutate non degradate. Inoltre abbiamo osservato che i mitocondri sono ridotti nel numero e presen-

tano creste disorganizzate; siamo andati quindi a misurare il trasferimento degli elettroni e il rapporto ATP/AMP rivelando una differenza significativa tra le cellule eFANCA e neFANCA sia dal punto di vista morfologico che funzionale. Il metabolismo energetico e la respirazione sono stati almeno parzialmente ripristinati trasferendo le cellule neFANCA con la forma wt di FANCA o con eFANCA sostenendo un ruolo potenziale di questa proteina a livello mitocondriale. La presenza di FANCA nel mitocondrio è stata confermata sia mediante western blot su frazioni cellulari che con saggi di immunogold.

**Conclusioni.** La scoperta che FANCA, come FANCG, si localizza nel mitocondrio apre delle ipotesi che potrebbero spiegare l'aumentato stato di ossidazione e apoptosi osservato in FA.

#### Co-009

##### CARATTERISTICHE BIOLOGICHE E FUNZIONALI DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI ISOLATE DA MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI AFFETTI DA $\beta$ -TALASSEMIA MAJOR

D.M. Ingo,<sup>1</sup> M. Mantelli,<sup>2</sup> E. Lenta,<sup>2</sup> M. Zecca,<sup>2</sup> R. Maccario,<sup>2</sup> M.E. Bernardo,<sup>1</sup> M.A. Avanzini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET), Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan; <sup>2</sup>Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

**Scopo.** Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti che costituiscono nel midollo osseo il microambiente fondamentale per la maturazione delle cellule staminali emopoietiche. La  $\beta$  talassemia è un'emoglobinopatia caratterizzata da alterata sintesi delle catene  $\beta$ -globiniche, con conseguente accumulo di ferro a livello plasmatico e d'organo ed emopoiesi extramidollare a livello epatico e splenico. L'obiettivo del nostro lavoro consiste nel valutare le caratteristiche fenotipiche e funzionali di MSCs ottenute da pazienti pediatrici con  $\beta$ -talassemia major ( $\beta$ -thal-MSCs), allo scopo di individuare eventuali alterazioni che potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia.

**Pazienti e Metodi.** Sono state isolate ed espanse *ex vivo* MSCs da midollo osseo (MO) di 4 pazienti pediatrici (mediana età 15, range 6-18). Le MSCs sono caratterizzate per capacità clonogenica (CFU-F) e proliferativa (cumulative Population Doubling cPD), morfologia, immunofenotipo (citofluorimetria a flusso), potenzialità di differenziare *in vitro* in adipociti e osteoblasti, capacità immunomodulanti

(inibizione della proliferazione linfocitaria indotta da PHA), capacità di supportare *in vitro* l'emopoiesi e senescenza. I risultati sono confrontati con quelli ottenuti da MSCs di 6 donatori sani (HD-MSCs) paragonabili per età e sesso.

**Risultati.** Le  $\beta$ -thal-MSCs mostrano tipica morfologia affusolata, risultano simili alle HD-MSC per capacità proliferativa (media cPD=7 e 7.45 per  $\beta$ -thal-MSC e HD-MSC, rispettivamente) e immunofenotipo, mentre mostrano un numero di CFU-F inferiore rispetto alle HD-MSCs (media $\pm$ DS: 0.7 $\pm$ 0.3/106; 5 $\pm$ 2/106 cellule piastrate, rispettivamente). Le  $\beta$ -thal-MSCs entrano in senescenza ad un passaggio medio di 11.5, mentre le HD-MSC ad un passaggio medio di 15.7. La valutazione della capacità *in vitro* di differenziare, di immunomodulare e di supportare l'emopoiesi è in corso.

**Conclusioni.** I dati preliminari ottenuti nel presente lavoro, mostrano una ridotta capacità clonogenica delle MSC da pazienti con  $\beta$ -talassemia; sono necessari ulteriori studi e la valutazione di un maggior numero di pazienti per comprendere il significato biologico di questo dato.

#### Co-010

##### STUDI GENOTIPO-FENOTIPO IN 70 PAZIENTI IRIDA

L. De Falco, M. Bruno, L. Silvestri, C. Kannengiesser, E. Moran, C. Oudin, M. Rausa, J. Aranda, B. Argiles, I. Yenicesu, M. Falcon-Rodriguez, E. Yilmaz-Keskin, U. Kocak, C. Beaumont, C. Camaschella, B. Grandchamp, M. Sanchez, A. Iolascon

CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

L'anemia sideropenica refrattaria al trattamento con ferro o IRIDA (codice OMIM:206200; ORPHA209981) è una patologia autosomica recessiva caratterizzata da un'anemia microcitica ipocromica, bassi livelli di ferro sierico, bassa saturazione della transferrina e livelli di ferritina normali o alti. L'epcidina sierica è inappropriatamente normale o alta per i bassi livelli di ferro. Il gene causativo dell'IRIDA è Tmprss6, che codifica per una serina proteasi, regolatore negativo della sintesi di epcidina. Ad oggi sono state riportate 41 diverse mutazioni nel gene Tmprss6. Abbiamo effettuato un'analisi di correlazione genotipo-fenotipo in 70 pazienti pediatrici IRIDA (39 dalla letteratura e 31 nuovi pazienti) divisi in due gruppi: gruppo A (n=44), pazienti con due mutazioni missense e con una mutazione missense in combinazione con un altro tipo di mutazione (nonsense, frameshift o mutazioni di splicing);